

Roman Wachowiak, Jarosław Tobolski

Wykorzystanie chromatografii gazowej w toksykologicznej analizie lotnych związków nieorganicznych w materiale biologicznym

Application of gas chromatography in toxicological analysis of volatile inorganic compounds in biological material

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej AM w Poznaniu
Kierownik: Prof. dr hab. med. Z. Przybylski

Diagnostyka chemiczna przypadków śmierci nagłej, związanej z zatruciami lotnymi związkami nieorganicznymi (CO, HCN, H₂S, SO₂) wymaga potwierdzenia zidentyfikowanego ksenobiotyku niezależną techniką badawczą. Zaproponowano metodę analizy jakościowo-ilościowej najczęściej spotykanych nieorganicznych trucizn lotnych (CO, HCN i H₂S) w materiale biologicznym przy użyciu chromatografii gazowej z zastosowaniem detektora przewodnictwa cieplnego (Thermal conductivity detector - TCD) oraz techniki headspace. Przydatność metody sprawdzono w warunkach rutynowej analizy toksykologicznej materiału sekcyjnego i porównano z innymi dotychczas stosowanymi technikami badawczymi.

Chemical diagnosis of sudden death cases associated with intoxications involving volatile inorganic compounds (CO, HCN, H₂S, SO₂) requires alternate confirmation of the identified xenobiotic, using an independent analytical technique. For the purpose, application of qualitative and quantitative analysis was suggested, of the most commonly encountered inorganic volatile toxic compounds (CO, HCN, H₂S), estimated in a biological material using gas chromatography with thermal conductivity detection and employing the headspace technique. Suitability of the technique was examined in routine toxicological analysis of autopsy material and the results were compared with those yielded by other, employed till now analytical techniques.

Zatrucia lotnymi truciznami nieorganicznymi stanowią znaczący udział w kazuistyce nagłych zgonów notowanych w Zakładach Medycyny Sądowej (6,7,8,9,10). Analiza statystyczna wskazuje na dominującą liczbę zgonów związanych z intoksykacją tlenkiem węgla w porównaniu z zatruciami cyjankami i siarkowodorem (1, 2, 4, 12).

Rutynowe, często skomplikowane i czasochłonne metody analityczne, dotyczące diagnostyki chemicznej zatruc tą grupą związków, oparte są najczęściej na zasadach spektrofotometrii w zakresie widzialnym (3, 5) i wymagają zawsze dodatkowego potwierdzenia inną niezależną techniką badawczą.

Dostępne dane piśmiennictwa (11,13) wskazują na ograniczone zastosowanie techniki chromatografii gazowej w analizie nieorganicznych trucizn lotnych w materiale biologicznym, co zdecydowało o jej wyborze w przeprowadzeniu odpowiednich badań.

Mając na uwadze właściwości fizykochemiczne badanych związków zastosowano chromatografię gazową z użyciem techniki headspace oraz detektora przewodnictwa cieplnego /TCD/, jako najbardziej przydatnego systemu ich wykrywania w porównaniu z innymi metodami fizykochemicznymi.

MATERIAŁY I METODY

Analizę jakościowo-ilościową badanych związków przeprowadzono przy użyciu chromatografu gazowego Chrom 5 prod. CSR wyposażonego w detektor przewodnictwa cieplnego (thermal conductivity detector – TCD). Dla wszystkich układów analitycznych zastosowano kolumny szklane o dł. 3,5 m i ϕ 3 mm, prąd katarometru 160 mA oraz użyto wodór (30 ml/min.) jako gaz nośny. Do analizy tlenku węgla jako wypełnienie kolumn zastosowano adsorbent – sito molekularne-5A /80-100 mesh/, które przed użyciem odpowiednio aktywowano. Kolumnę wypełnioną adsorbentem po zainstalowaniu w aparacie ogrzewano przy przepływie azotu (20-30ml/min.) w kolejnych przedziałach czasowych: 12 godzin-temp. 250°C, 4 godziny w temp. 300°C i 2 godziny w temp. 350°C.

Do analizy (HCN, H₂S, SO₂, CO₂) wypełnienie kolumn stanowił Hays-Sep Q (80-100 mesh), który przed użyciem po umieszczeniu w kolumnie aktywowano w termostacie chromatografu przez 5 godzin w temp. 200°C, przy przepływie azotu (20-30 ml/min.).

Parametry temperaturowe dla optymalnych warunków analizy jakościowo-ilościowej badanych związków wynosiły odpowiednio: termostat – 120°C (CO), 100°C (H₂S), 150°C (HCN), 180°C (SO₂); komora nastrzykowa 90°C (CO), 80°C (H₂S), 80°C (HCN), 120°C (SO₂). Podczas równoczesnej analizy mieszanej wzorcowej temp. termostatu i komory nastrzykowej wynosiła 70°C.

Badania jakościowo-ilościowe przeprowadzono uproszczoną techniką headspace polegającą na analizie par pobranych z roztworu badanego. Analizę wykonano używając fiolek o poj. 5.0 cm³ ± 0.1 cm³ zamykanych szczelnie teflonową nakrętką z gumową membraną.

W analizie porównawczej poziomu hemoglobiny tlenkowej (HbCO) i zawartego w niej tlenku węgla metodą chromatograficzną wykorzystano zmodyfikowaną metodę Wolffa. Indywidualną wartość hemoglobiny osobniczej odniesiono do maksymalnej wartości (HbCO), ustalonej po uprzednim wysyceniu próbki krwi badanej tlenkiem węgla, który otrzymano z generatora (reakcja 80% HCOOH z stęż. H₂SO₄). Analiza spektrofotometryczna tej samej próbki krwi przed i po wysyceniu tlenkiem węgla, pozwala na precyzyjne określenie w niej faktycznego stężenia hemoglobiny tlenkowej. W przypadku analizy CN⁻ wykorzystano reakcję barwną chlorocyjanu z kwasem barbiturowym w bezwodnej pirydynie ($\lambda=580$ nm), który otrzymano w reakcji z chloraminą T (5). W analizie siarkowodoru wykorzystano metodę spektrofotometryczną (3) (UV-VIS/ λ -670 nm), polegającą

na jego selektywnej reakcji z N-N-dimetylo-p-fenylendiaminą, w następstwie której powstaje błękit metylenowy.

WYKONANIE OZNACZENIA

Analiza tlenku węgla (CO) w hemoglobinie tlenkowej

Do próbki krwi (1 cm^3) umieszczonej w fiolce reakcyjnej (headspace) zakręconej nakrętką z gumową membraną wprowadzono 0.5 cm^3 roztworu uwalniającego tlenek węgla - saponina (0,5 g) i $\text{K}_3\text{Fe}/\text{CN}/_6$ (2 g) w $10 \text{ cm}^3 \text{ H}_2\text{O}$. Następnie po 4 min. lekkiego wytrząsania w temp. 20°C uwolniony tlenek węgla zawarty w obj. 0.5 cm^3 par znad roztworu wprowadzono do komory nastrzykowej chromatografu gazowego.

Analiza cyjanowodoru (HCN) we krwi

Próbkę krwi (1 cm^3) umieszczono w fiolce reakcyjnej i po zamknięciu wprowadzono 0.5 cm^3 10 % H_2SO_4 . Po okresie inkubacji w 60°C (5 min.) pobrano 0.5 cm^3 gazu znad roztworu i wprowadzono do chromatografu gazowego.

Warunki badań siarkowodoru (H_2S) i dwutlenku siarki (SO_2)

Roztwory próbek badanych, zawierające roztwory wzorcowe $\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$ w przeliczeniu na H_2S lub Na_2SO_3 w przeliczeniu na SO_2 w surowicy krwi ludzkiej, umieszczono w fiolce reakcyjnej (1 cm^3) i po zadaniu 10% H_2SO_4 (0.5 cm^3) analizowano analogicznie jak w przypadku cyjanowodoru (zakres stężeń zgodny z danymi umieszczonymi w tab. I).

Krzywe kalibracyjne

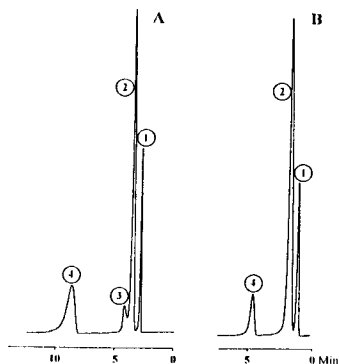
Obliczenie stężeń badanych związków (HCN , H_2S , SO_2) dokonano po uprzednim sprawdzeniu zależności $R=f/c$, w której uwzględniono stężenie oznaczonego składnika $/c/$ do wysokości piku badanego związku na chromatogramie (h mm) lub wskazań liczbowych integratora. Przeprowadzone badania kalibracyjne (tab. I) wykazały liniową zależność $y=ax$ dla wszystkich badanych związków (zakres współczynnika korelacji powyżej 0,95). Roztwory wzorcowe badanych związków otrzymano z odpowiednich soli, które w środowisku kwaśnym uwalniały żądany produkt gazowy. W tym celu wykorzystano następujące podstawowe roztwory wzorcowe, z których przygotowano odpowiednie rozcieńczenia do tej samej objętości (10 cm^3): $0.12037 \text{ g KCN} = 0.05 \text{ g HCN}$ (10 cm^3); $0.7059 \text{ Na}_2\text{S} \times 9 \text{ H}_2\text{O} = 0.1 \text{ g H}_2\text{S}$ (10 cm^3); $0.197 \text{ g Na}_2\text{SO}_3 = 0.1 \text{ g SO}_2$ (10 cm^3).

W przypadku diagnostyki CO w HbCO analizę ograniczono do analizy jakościowej, potwierdzając wstępnie proporcjonalną zależność pomiędzy wartością stężenia hemoglobiny tlenkowej a wysokością piku uwolnionego tlenku węgla (zakres 10-100% HbCO określonej zmodyfikowaną metodą Wolffa). Ze względu na wyjątkowe znaczenie diagnostyki chemicznej zatruc tlenkiem węgla jego analiza ilościowa w hemoglobinie tlenkowej metodą chromatografii gazowej będzie przedmiotem osobnej publikacji.

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

Podstawowym kryterium warunkującym akceptację każdej metody analitycznej dla celów rutynowych badań laboratoryjnych, a szczególnie toksykologicznych, jest jej specyficzność, oznaczalność, czasochłonność wykonawcza oraz względy ekonomiczne. Zaproponowane metody chromatograficznej analizy jakościowo-ilościowej najczęściej spotykanych lotnych trucizn nieorganicznych pozwala na ich szybką identyfikację w badanym materiale biologicznym. Użycie sita molekularnego 5A jako wypełnienia kolumny chromatograficznej umożliwia jedynie analizę związków o charakterze obojętnym (CO , CH_4 , N_2 , O_2) nie reagujących z tlenkami zasadowymi, stanowiącymi jego strukturę fizykochemiczną.

Efekt rozdzielenia tlenu węgla uwolnionego z połączenia w hemoglobinie tlenkowęglovej, obok towarzyszących zawsze składników powietrza (O_2 , N_2) oraz mieszaniny wzorcowej, zawierającej dodatkowo metan (częsty produkt biodegradacji) przedstawia rycina 1.



Ryc. 1. Rozdział chromatograficzny lotnych związków nieorganicznych uzyskany na sicie molekularnym 5A.

A – Mieszanka wzorcowa. B – Analiza tlenu węgla uwolnionego z hemoglobiny tlenkowęglovej (45% HbCO)

1 – tlen, 2 – azot, 3 – metan, 4 – tlenek węgla

Fig. 1. Chromatographic separation of volatile inorganic compounds on molecular sieve 5A.

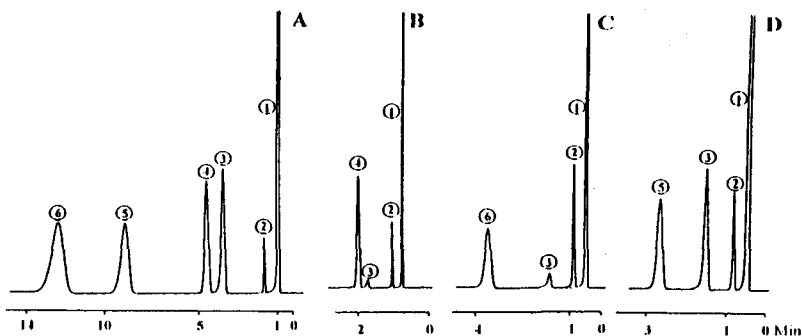
A – Standard mixture of examined compounds. B – Analysis of carbon monoxide released from carboxyhemoglobine (45 % HbCO)

1 – oxygen, 2 – nitrogen, 3 – methane, 4 – carbon monoxide

Przedstawione badania wykazały całkowitą nieprzydatność sita molekularnego 5A do analizy lotnych związków nieorganicznych o charakterze tlenków kwasowych (SO_2 , CO_2), kwasów (HCN , H_2S), jak również zawsze towarzyszącej wody. Aktywne właściwości zasadowych tlenków metali alkalicznych tworzących strukturę sita 5A sprawiają, że spełnia ono rolę pułapki dla tej grupy związków, uniemożliwiając ich swobodny rozdział w kolumnie i tym samym rejestrację na

chromatogramie. Dla celów analizy ilościowej związków o charakterze kwaśnym (HCN, H₂S, SO₂, CO₂) zastosowano wypełnienie Haye Sep Q, jako najbardziej przydatne w tym względzie. Efekt chromatograficznego rozdzielania mieszaniny wszystkich badanych składników przedstawia Ryc.2, na której wyeksponowano dodatkowo rozdziły uzyskane podczas rutynowej analizy jakościowo-ilościowej poszczególnych związków wyodrębnionych z materiału sekcyjnego.

Ryc. 2. Rozdział chromatograficzny lotnych związków nieorganicznych uzyskany



na Haye Sep Q.

A – Mieszanina wzorcowa. B – Analiza siarkowodoru (materiał sekcyjny-zgnięta wątrba)

C – Analiza dwutlenku siarki (uwolniony z 1% wodnego roztworu Na₂SO₃) D – Analiza cyjanowodoru (krew sekcyjna-przypadek zatrucia)

1 – N₂, O₂, 2 – CO, CO₂, 3 – H₂O, 4 – H₂S, 5 – HCN, 6 – SO₂.

Fig. 2. Chromatographic separation of volatile inorganic compounds on Haye Sep Q.

A – Standard mixture. B – Analysis of hydrogen sulfide (autopsy material-putrefacted liver)

C – Analysis of sulphur dioxide (released from aqueous solution of 1% Na₂SO₃)

D – Analysis of hydrogen cyanide (autopsy blood-intoxication case)

1 – N₂, O₂, 2 – CO, CO₂, 3 – H₂O, 4 – H₂S, 5 – HCN, 6 – SO₂

Analiza wartości czasów retencji badanych związków analizowanych w wodnych roztworach wzorcowych i w materiale biologicznym wykazuje zawsze obecność pików wody oraz dwutlenku węgla wśród badanych składników.

Obecność dwutlenku węgla zawartego w powietrzu atmosferycznym, jak również w wodzie używanej do przygotowania roztworów pomocniczych można ograniczyć, względnie wyeliminować całkowicie poprzez jej zagotowanie w atmosferze azotu lub użycie bezpośrednio po destylacji.

Przeprowadzone badania wykazały nieprzydatność wypełnienia Haye Sep Q do analizy jakościowej tlenku węgla, który posiada ten sam czas retencji co dwutlenek węgla.

Równocześnie ustalono, że obecność obok siebie dwutlenku siarki i siarkowodoru stanowi układ oksydacyjno-redukcyjny, prowadzący do ich przemiany w nietołą siarkę.

Ta właściwość obu związków sprawia, że nie można ich wzajemnie stosować jako odpowiednich wzorców wewnętrznych w analizie ilościowej.

Sprawdzony zakres kalibracji oraz oznaczalność badanych związków (przedstawione w tab. I) wskazują na przydatność metody chromatograficznej w badaniach toksykologicznych materiału biologicznego.

Tabela I. Zakres kalibracji badanych związków oraz ocena statystyczna powtarzalności oznaczeń.

Table I. Calibration range of examined compounds and statistic evaluation of reproducibility of results.

BADANY ZWIĄZEK Examined compound	METODA GLC		METODA UV-VIS
	Zakres kalibracji mg/0.5 cm ³ nastrzyku headspace Calibration range mg/0.5 cm ³ headspace volume	Ocena statystyczna powtarzalności $Sr = \frac{Sx100}{\bar{x}}$ n=5 Statistic evaluation of reproducibility	Zakres kalibracji mg/10 cm ³ Calibration range
Cyjanowódor (HCN)	0.0125 – 0.5	4.52	0.001 – 0.05
Siarkowódor (H ₂ S)	0.02 – 0.6	5.84	0.002 – 0.05
Dwutlenek siarki (SO ₂)	0.05 – 0.4	6.21	–
Tlenek węgla (CO) w HbCO	Wykrywalność w przedziale detection range 10 – 100% HbCO	7.20	–

Ocena porównawcza zakresów kalibracji uzyskanych podczas stosowania chromatografii gazowej w analizie ilościowej cyjanowodoru i siarkowodoru, wskazuje na około 10 krotnie niższy rząd oznaczalności, w porównaniu z osiągniętymi metodami spektrofotometrycznymi.

Mając na uwadze wysoki poziom analizowanych związków spotykany w materiale biologicznym w warunkach intoksykacji, opracowana metoda może być z powodzeniem wykorzystana do potwierdzenia obecności cyjanowodoru, siarkowodoru i tlenku węgla w materiale sekcyjnym. Szczególne znaczenie dotyczy jej wykorzystania w analizie powietrza, w którym nastąpiło zatrucie, bowiem obok udziału lotnych trucizn nieorganicznych nie bez znaczenia jest określenie stężenia tlenu (pomieszczenia szamb, systemów kanalizacyjnych) determinującego możliwość śmierci nagłej, gwałtownej z racji anoksemii.

Zaproponowana technika badawcza wykazała dużą przydatność detektora przewodnictwa cieplnego (TCD), charakteryzującego się wysoką specyfiką wykrywania lotnych związków nieorganicznych, warunkującą ich analizę jakościowo-ilościową w materiale sekcyjnym.

PIŚMIENNICTWO

1. Adelson L., Sunnshine I.: Fatal hydrogen sulfide intoxication. Arch. Pat.h 1996, 81, 375-380. –2. Campanya M., Sanz P.: Fatal hydrogen sulfide poisoning. Med. Law., 1989, 80, 251-253. –3. Deberere J.M., Voets J.P.: A rapid microdiffusion method for the determination of sulfides in biological fluids. Lab. Prac., 1972, 21, 713-714. –4. Deng J.F., Chang S.C.: Hydrogen sulfide poisoning in hot-spring reservoir cleaning; two case report. Am. J. Ind. Med., 1987, 11, 447-451. –5. Feldstein M., Klendshaj N.C: The determination of cyanide in biological fluids by microdiffusion analysis. J. Lab. Clin. Med. 1954, 44, 166-170. –6. Hauser R., Miścicka D.: Zatrucia śmiertelne w Gdańsku w latach 1970-1979. Arch. Med. Sąd. Krym. 1982, 32, 39-45. –7. Kłys M., Baran E.: Zatrucia śmiertelne w materiale Zakładu Medycyny Sądowej w Krakowie w latach 1946-1995. Arch. Med. Sąd. Krym., 1996, 46, 277-287. –8. Marek Z., Packo Z.: Zatrucia śmiertelne w Krakowie w latach 1947-1973. Arch. Med. Sąd. Krym. 1975, 25, 69-76. –9. Molenda R.: Wpływ stężenia etanolu na toksyczność tlenku węgla. Arch. Med. Sąd. Krym. 1991, 31, 178-184. –10. Pach. J., Marek Z., Kamenczak A., Winnik L.: Ocena zagrożenia ostrymi zatruciami substancjami chemicznymi mieszkańców Krakowa w roku 1993. Arch. Med. Sąd. Krym. 1994, 44, 281-291.

11. Sakata M., Haga M.: Determination of carbon monoxide in blood by headspace analysis. J. Toxicol. Sci. 1980, 5 35-43. –12. Vathanen A.S.: Hydrogen sulfide poisoning in factory worker, 1988, 18, 245-248. –13. Volentour J.C., Aggarwall V., Sunshine J.: Sensitive gas chromatographic determination of cyanide. Anal. Chem. 1974, 46, 924.

Adres autorów:

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej AM w Poznaniu,
60-781 Poznań,
ul. Święcickiego 6.